Контактная информации об авторах для переписки

Поломошнов Никита Андреевич, аспирант Донского Государственного Аграрного Университета, 346493 Ростовская область, Октябрьский (с) район, п. Персиановский ул. Дачная 22. Тел: 8(86360)3-62-09, 8(909)423-37-06. Электронный адрес: persia@list.ru

Малышева Людмила Александровна, доктор ветеринарных наук профессор, заведующая кафедрой микробиологии вирусологии и патанатомии Донского Государственного Аграрного Университета, 346421 Ростовская область г. Новочеркасск ул. Ветеринарная 16, кВ. 5 Тел: 8 (86352) 26-69-73, моб.: 8 (909)436-52-92.

УДК 619:616.98:578

Сальников Н.И., Живодеров С.П., Малоголовкина Н.В., Цыбанов С.Ж., Колбасов Д.В.

(ГНУ Всероссийский научно –исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии.)

ТЕСТ – СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОМА ВИРУСА БОЛЕЗНИ НАЙРОБИ МЕТОДОМ ОТ – ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Ключевые слова: болезнь Найроби, вирус, тест – система, ОТ –ПЦР, ПЦР в режиме реального времени.

Введение.

Болезнь Найроби овец – зооантропонозная трансмиссивная болезнь овец, коз и человека, проявляющаяся рецидивирующей лихорадкой, геморрагическим гастроэнтеритом, гломерулонефритом, слизисто –гнойными выделениями из носа и диареей; характеризуется уровнем смертности, который может варьировать между 40 и 90% [1].

Болезнь постоянно регистрируется в Кении, Танзании и Мозамбике и в Индии[2]. Согласно данным МЭБ вспышки болезни Найроби были зарегистрированы также на Ближнем Востоке (Кувейт, 1995г.) и в Европе (Греция, 2003г.). Источником инфекции являются больные овцы и козы, а также скрытые вирусоносители [4].

Возбудителем инфекции является вирус рода Nairovirus сем. Bunyaviridae, наиболее тесно связанный с вирусами Дугбе и Конго – Крымской геморрагической лихорадки. Вирус Ганджам, вызывающий в Индии гастроэнтериты у овец и коз, является азиатским вариантом вируса болезни Найроби [3].

Во время вспышки болезни Найроби при проведении противоэпизоотических мероприятий необходимо проведение быстрых и точных экспертизных исследований, позволяющих в кратчайшие сроки идентифицировать возбудитель. В настоящее время одним из таких методов является ПЦР в режиме реального времени.

Цель настоящей работы – разработка тест – системы на основе ОТ – ПЦР в режиме реального времени для выявления генома вируса болезни Найроби, оценка ее чувствительности и специфичности.

Материалы и методы.

В эксперименте использованы штаммы «ММ/К-05» и «Х» вируса болезни Найроби, а также вирусы лихорадки долины Рифт (штаммы «1974 –ВНИИВВиМ» и «RVF - 113/09 –ПС»), болезни Акабане (штамм «B8935»), болезни Ибараки (штаммы «Susaki» и «Kyushi») и блютанга (6 серотип, штамм «NET-2007») из лаборатории музейных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Выделение вирусной РНК проводили с использованием «Тризола» (Trizol Reagent; «Life Technology», США) по методике производителя.

Анализ нуклеотидных последовательностей и подбор праймеров осуществляли с помощью программ «Bio Edit 7.0», «Oligo 6.0» и интернет-сервиса «BLAST!» (http://www.ncbi.gov.nlm.com).

Реакцию обратной транскрипции проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 10 пкмоль обратного праймера, 0,03 ммоль дНТФ, 0,07 ммоль

$MgCl_2$, 1,88 ммоль KCl, 1,25 ммоль Трис – HCl (pH=7,5), 0,25 ммоль ДТТ, 30 ед. MMLV – ревертазы. В пробирки с реакционной смесью под масло вносили по 5 мкл РНК, далее пробирки инкубировали на термостате в течение 30 мин при температуре 42 С и 5 мин при температуре 88 С.

Полимеразную цепную реакцию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей по 10 пкмоль праймеров, 0,3 пкМ зонда, 0,03 ммоль дНТФ, 0,08 ммоль $MgCl_2$, 1,88 ммоль KCl, 1,25 ммоль Трис – HCl (pH=7,5), 3 ед. Taq –полимеразы. На поверхность реакционной смеси наслаивали 13 мкл расплавленного воска, на воск наносили 5 мкл кДНК. ПЦР в режиме реального времени проводили на детектирующем амплификаторе «Rotor –Gene 6200» («Corbett Research», Австралия) по программе : 94°С -2 мин (предварительная денатурация ДНК); 94°С -15 с, 63°С -15 с, 72°С -30 с (5 циклов без детекции); 94°С -15 с, 63°С -15 с, 72°С -30 с (40 циклов, детекция флуоресценции при температуре 63°С по каналу Yellow/Hex).

Результаты исследований и обсуждение.

На первом этапе работы был проведен анализ доступных в базе данных Gen Bank нуклеотидных последовательностей различных штаммов S – сегмента генома вируса болезни Найроби. В результате были подобраны олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие фрагмент размером 105 пар оснований внутри гена нуклеокапсидного белка N. Для детекции продуктов амплификации в режиме реального времени подобран зонд технологии Taq –man, содержащий на 5›-конце излучатель флуоресценции HEX, а на 3›-конце – гаситель BHQ2.

Оптимизацию условий постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием в качестве мишеней для отжига праймеров препараты РНК, выделенные из культуры клеток почки сайги, инфицированной вирусом болезни Найроби, шт. «ММ/К-05» и 20% суспензии мозга белых мышей –сосунков, инфицированных вирусом болезни Найроби, шт. «ММ». Эмпирическим путем были подобраны оптимальная температура отжига праймеров - 63°С, концентрации $MgCl_2$ (3,3 мкМ), дНТФ (0,3 мкМ), зонда (0,12 пкмоль/мкл) и праймеров (0,4 пкмоль/мкл) в реакционной смеси для амплификации.

Аналитическую чувствительность Real –Time ПЦР определяли, исследуя препараты РНК, выделенные из последовательных десятикратных разведений культурального материала, содержащего вирус болезни Найроби (культура клеток почки сайги, исходный титр инфекционной активности - 6,2 lg ТЦД50/см3). Пределом чувствительности считали максимальное разведение, при котором регистрировали положительный результат. Рассчитанное значение аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени составило 0,2 lg ТЦД50/см3 (рис.1).

Специфичность тест – системы оценивали путем исследования препаратов РНК вирусов болезни Найроби, лихорадки долины Рифт, болезней Акабане и Ибараки, блютанга, а также препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из крови интактных овец, коз и коров. Положительные результаты были получены только для препаратов РНК вируса болезни Найроби, что свидетельствует о специфичности разработанной тест – системы.

Для доказательства возможности применения разработанной тест – системы в лабораторной практике провели заражение двух овец вирусом болезни Найроби, штамм «Х» (дефибринированная вирус – кровь от инфицированной овцы). При этом одной овце вирус вводили внутривенно, а другой – подкожно. Обеим овцам было введено по 100 инфекционных единиц вируса. У зараженных животных ежедневно измеряли температуру тела и брали кровь, которую исследовали на наличие генома вируса болезни Найроби с помощью разработанной тест – системы.

Наиболее остро болезнь протекала у овцы, инфицированной внутривенно : температура тела уже на 3 сутки поднялась до 41,8 С, в последующем у нее наблюдали угнетение, отказ от корма, диарею с примесью крови; на 7 сутки животное пало. Начиная с 3 суток после инфицирования, в крови выявляли геном вируса болезни Найроби.

Вторая овца (инфицированная подкожно) осталась жива, на 4 сутки после инфицирования температура тела у нее повысилась до 41,7 С и держалась на этом уровне 4 суток, после чего стала постепенно снижаться и на 13 сутки достигла физиологической нормы. Геном вируса болезни Найроби в крови этой овцы выявляли с 4 до 7 суток; начиная с 8 суток (т.е. после падения температуры) геном возбудителя не выявляли.

С помощью разработанной тест – си-

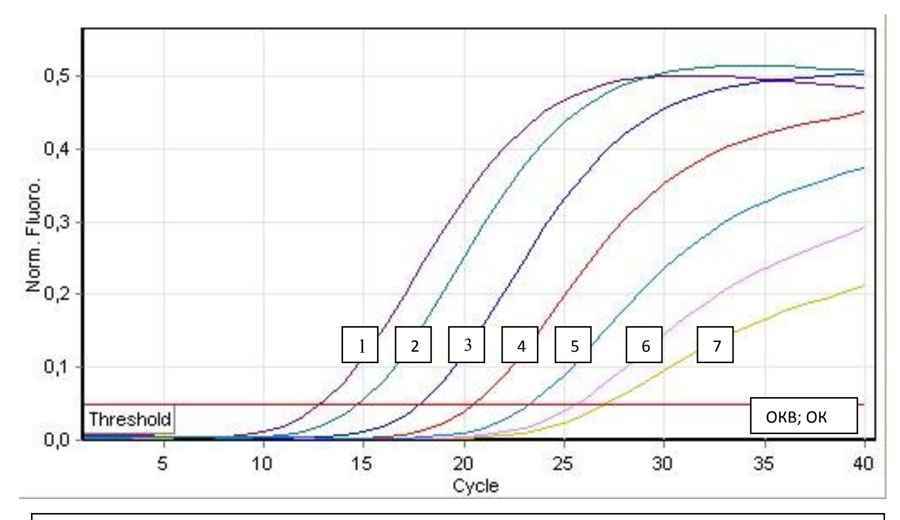


Рис.1. Выявление генома вируса болезни Найроби в разведениях культурального материала (культура клеток почки сайги).

Цифрами обозначены титры вируса (lg ТЦД $_{50/см^3}$) : 1 - 6,2; 2 – 5,2 ; 3 - 4,2; 4 – 3,2; 5 – 2,2 ; 6 – 1,2 ; 7- 0,2. ОКВ – отрицательный контроль выделения; ОК – отрицательный контроль ПЦР.

стемы были исследованы пробы органов от павшей овцы. Геном вируса болезни Найроби был обнаружен в пробах сердца, печени, легких, селезенки, слепой кишки и брыжеечного лимфатического узла.

Заключение.

Разработана тест – система для выявления генома вируса болезни Найроби методом ОТ – ПЦР в режиме реального времени. Тест – система позволяет дифференцировать вирус болезни Найроби от возбудителей, вызывающих у овец и коз болезни со сходными клиническими признаками –вирусов лихорадки долины Рифт, болезней Акабане и Ибараки, блютанга.

В ходе проведенной работы была установлено, что для анализа на наличие генома вируса болезни Найроби методом ОТ – ПЦР в режиме реального времени могут быть использовать пробы крови, сердца, легких, печени, почки, селезенки, слепой кишки и лимфатических узлов от инфицированных, павших или вынужденно убитых животных.

Резюме: В данной статье изложены этапы разработки тест – системы для выявления генома вируса болезни Найроби на основе ОТ – ПЦР в режиме реального времени. Представлены результаты испытания специфичности и чувствительности тест – системы, а также исследования проб органов и крови от экспериментально зараженных животных.

SUMMARY

In the given article the stages of development of the test - system for detecting of Nairobe sheep disease virus genome based on reverse –transcription Real –Time PCR are stated. The results of test of specificity and sensitivity of the test - system, and also analysis of the samples of organs and blood from experimentally infected animals are presented.

Keywords: Nairobe sheep disease, virus, test – system, reverse –transcription PCR, Real –Time PCR.

Литература

1. Арбовирусы и заболевания человека // Доклад научной группы ВОЗ (технический доклад № 369).- Женева, 1968.- С.30-38.

2. Davies, F.G. Nairobi sheep disease / F.G. Davies -Parasitologia.-1997.- Vol.39, №2, P. 95-98.

3. Marczinke, B.I. Nairobi sheep disease virus, an important tick-borne pathogen of sheep and goats in Africa, is also present in Asia / B.I. Marczinke and S.T. Nichol //Virology.-2002.-Vol.303,№1.-P.146-51.

4. Nairobi Sheep Disease//Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines.- Paris: World Organization for Animal Health, 2000.-P. 868–872.

Контактная информации об авторах для переписки

Н.И. Сальников, аспирант;

С.П Живодеров, к.в.н., зав. научно –экспериментальным отделом;
Н.В. Малоголовкина, к.в.н., с.н.с. научно –экспериментального отдела;
С.Ж. Цыбанов, д.б.н., профессор, зав. лаборатории Биофизики;
Д.В. Колбасов, д.в.н., профессор, директор института.
Государственное научное учреждение Всероссийский научно–исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии.

УДК 619:579.834.115.

Семенцов В.И., Болоцкий И.А., Кружнов Н.Н., Пруцаков С.В., Сусский Е.В., Ярцев С.Н.
(Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт, ФГУП «Армавирская биофабрика»)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ВНУТРИКОЖНОЙ ВАКЦИНАЦИИ СВИНЕЙ ПРОТИВ ЛЕПТОСПИРОЗА

Ключевые слова: эпизоотология, псевдомоноз, патогеность, вирулентность, биологические свойства, свиньи, корма

Введение. Специфическая профилактика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных в условиях интенсивного ведения животноводства имеет важное значение [1,2,3]. Для вакцинации животных затрачивается огромное количество ручного труда и материалов. Поэтому вопрос разработки более современных методов вакцинации является актуальным.

Исследованиями на примере сибирской язвы доказано, что кожа является не только самым чувствительным органом, но и местом реализации иммунных процессов. Об активном участии кожи в иммунологических процессах, выполнении одновременной роли центрального и периферического органа иммуногенеза сообщают в обстоятельных исследованиях российские специалисты [2,4]. Ранее разработанный безигольный метод внутрикожной вакцинации свиней против рожи сокращает расход вакцины и обеспечивает повышение производительности труда в 10 раз по сравнению с внутримышечной иммунизацией.

В связи с этим внутрикожный метод заслуживает более пристального изучения так как по своим потенциальным возможностям превосходит подкожный и внутримышечный методы введения вакцинных препаратов [4]. Кроме того, применение безигольных инъекторов позволяет исключить «игольные инфекции», решить задачи экспрессности.

При наличии в ветеринарной практике автономных инъекторов на пру-жинном взводе (ИБВ-0,2, ВИ-7, «Овод» и др.) рассчитанных на внутрикожное введение препарата в объемах 0,1-0,2 см3 и изучение безигольного метода внутрикожной вакцинации животных приобретает актуальное значение.

Цели и задачи исследований. Целью исследования было изучение воз-можности внутрикожного введения свиньям безигольным инъектором депони-рованной поливалентной вакцины против лептоспироза и ассоциированной вакцины ПЛАХ. Установлено, что вязкость вакцин позволяет вводить их безигольным внутрикожным методом. Кожа шеи, спины, ягодичных областей и на боках свиней является удобным местом введения вакцин.

Материалы и методы. В первом опыте было привито 20 свиноматок. Первой группе вводили внутрикожно по 0,4 см3, второй группе 0,2 см3, и третьей внутримышечно по 2 см3. Применялась экспериментальная концентрированная вакцина против лептоспироза. Контрольной четвертой группе вводили по 10 см3 поливалентной вакцины ВГНКИ.

У опытных животных через каждый месяц в течение полугода брали кровь и исследовали сыворотку на наличие специ-